

文章编号: 0258-7025(2009)10-2705-07

光动力疗法抑制人免疫缺陷病毒复制的实验研究

阴慧娟¹ 郑永唐² 李迎新¹ 李春艳² 邹朝辉¹ 赵宇¹

¹ 天津医科大学生物医学工程系激光医学实验室, 天津 300070

² 中国科学院昆明动物研究所动物模型与人类疾病机理重点实验室, 分子免疫药理学实验室, 云南 昆明 650223

摘要 通过对人免疫缺陷病毒复制过程的抑制作用研究, 探索光动力疗法(PDT)在艾滋病防治中的潜在价值。使用不同稀释浓度的光敏剂血卟啉单甲醚(HMME)和亚甲蓝(MB)分别与人免疫缺陷病毒 HIV-1_{III_B}或宿主细胞 MT4, C8166 或 H9/HIV-1_{III_B}孵育 2 h, 以波长 630 nm 能量密度 0.3 J/cm² 的半导体激光进行照射。继续孵育若干小时后, 用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞存活率或合胞体计数, 同时收集培养上清液用 ELISA 法检测 HIV-1 p24 抗原。结果表明, 光动力疗法能显著抑制人免疫缺陷病毒诱导的细胞-细胞融合(HMME-PDT 抑制率 64.68%, MB-PDT 抑制率 61.56%)和病毒-细胞融合(HMME-PDT 抑制率 85%, MB-PDT 抑制率 73.64%), 并对游离病毒有很强的杀伤作用, 最高可达到 100%。光动力疗法不能抑制慢性感染期和急性感染 2 h 后病毒的复制过程。可见光动力疗法对游离病毒和病毒感染诱导的膜融合有显著抑制作用, 有可能为艾滋病的防治提供一种新的方法。

关键词 医学光学; 光动力疗法; 人免疫缺陷病毒; 血卟啉单甲醚; 亚甲蓝

中图分类号 R318.51 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2705

Photochemical Inactivation of Cell-Associated and Cell-Free Human Immunodeficiency Virus in Vitro

Yin Huijuan¹ Zheng Yongtang² Li Yingxin¹ Li Chunyan² Zou Zhaohui¹ Zhao Yu¹

¹ Laser Medicine Laboratory, Department of Biomedical Engineering, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

² Laboratory of Molecular Immunopharmacology, Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China

Abstract Aim to explore a potential treatment of AIDS-photodynamic therapy by detecting the photoinactivation on human immunodeficiency virus (HIV) in vitro, mixed the photosensitizers hematoporphyrin monomethyl ether or methylene blue by a series of dilute strengths with the host cells MT4, C8166 or H9/HIV-1_{III_B} or the virus HIV-1_{III_B} for 2 hours incubation, followed by irradiation by a 630 nm semiconductor laser with energy density 0.3 J/cm². After certain time, the activities against HIV-1_{III_B} were assayed by determining the syncytial formation under the inverted microscope or MTT and measuring the p24 antigen expression level in supernatant by ELISA. Results show PDT inhibited the cell-cell fusion (inhibition rate, HMME-PDT 64.68%, MB-PDT 61.56%) and virus-cell fusion (inhibition rate, HMME-PDT 85%, MB-PDT 73.64%) induced by HIV-1_{III_B} significantly, and had an intensive inactivation on the cell-free HIV-1_{III_B} especially the inhibition rate up to 100%. However, PDT had no effect on the replication course 2 hours after acute infection or chronic infection of HIV-1_{III_B}. Therefore PDT has outstanding inhibition on cell-free HIV-1_{III_B} and fusion induced by HIV-1_{III_B}, which prompts PDT may be a new treatment of AIDS in future.

Key words medical optics; photodynamic therapy; human immunodeficiency virus; hematoporphyrin monomethyl ether; methylene blue

收稿日期: 2009-07-09; 收到修改稿日期: 2009-08-11

基金项目: 国家自然科学基金(60678047)资助课题。

作者简介: 阴慧娟(1981—), 女, 博士研究生, 主要从事激光医学方面的研究。E-mail: yinzi490@163.com

导师简介: 李迎新(1959—), 男, 博士, 教授, 主要从事激光医学方面的研究。E-mail: yingxinli@tjmu.edu.cn(通信联系人)

1 引 言

光动力疗法(PDT)也称光化学法,是指患者(主要是肿瘤患者)局部或全身给予光敏剂药物特定时间后,以特定波长的可见光(通常是激光)对病损局部进行照射,在有氧参与下光敏剂受激发,发生能量传递或电子传递,产生活性氧物质(主要为单态氧),对周围的生物大分子如蛋白质、核酸等产生破坏作用,从而导致细胞死亡或组织损伤^[1]。从20世纪80年代 PDT 兴起以来,它作为一种新型的肿瘤治疗方法已经历了大约30年,并且疗效显著。目前,被许多国家批准或待批准的可用 PDT 治疗的肿瘤达20多种,如肺癌^[2]、胃肠道癌^[3]、头颈部癌^[4]、膀胱癌^[5]、前列腺癌^[6]、肝癌^[7]、皮肤癌和光化性角化症^[8]等。而 PDT 的非损伤或低损伤特性也使得它在非恶性疾病如皮肤病学^[9]、眼科学^[10]和心脏病学^[11]等方面得到广泛的应用。另外研究证明 PDT 在局部病毒性疾病如疱疹^[12]和尖锐湿疣^[13]方面有很好的疗效。它还可用于清除血液或血液制品中的病毒和细菌等微生物,为血液和血液制品的净化提供一种选择。在这些研究中,人类免疫缺陷病毒(HIV)的灭活尤其引人注目。在20世纪90年代,PDT 灭活血液制品中 HIV 的研究成为焦点,由于效果非常显著,有些研究小组试图把研究方向放在 PDT 治疗艾滋病上,但是由于当时光敏剂存在的诸多不良反应以及激光器制造技术的落后,阻碍了该方面的研究。第二代光敏剂和新型激光器^[14~16]的问世,为 PDT 在艾滋病防治中的应用研究提供了条件。本文将通过研究体外 PDT 对 HIV 复制的抑制作用探索 PDT 防治艾滋病的可能性。

2 材料和方法

2.1 材 料

光敏剂亚甲蓝(MB)注射液购自天津医科大学总医院急诊药房,2 mg:2 mL;血卟啉单甲醚(HMME)购自上海张江生物科技有限公司,12 mg/mL,10 mL。630 nm 波长半导体激光器由本实验室自行研制。病毒株 HIV-1_{III_B}以及人 T 淋巴细胞系 C8166, H9/HIV-1_{III_B}和 MT-4 均保存于中国科学院。细胞用体积分数为 10% 胎牛血清(FCS)的 RPMI-1640 10 mL, 37 °C 体积分数(以下同)为 5% 的 CO₂ 培养。每隔 3 天传代。实验前 1 天传代一次,使所用细胞处于对数生长期。RPMI-1640 和 FCS 为 Gibco 公司产品;牛血清白蛋白、抗

IgG Fc 抗体购自 Sigma 公司;抗 HIV p24 单克隆抗体 P5F1 和兔抗 HIV-1 p24 多克隆抗体由昆明动物研究所分子免疫药理学实验室制备;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人 IgG 抗体购自华美生物工程公司。MTT, SDS, DMF 和 Triton X-100 均购自 Sigma 公司。10 g SDS 加入 50 mL 水中混匀后再加入 50 mL DMF 配制成 10% SDS-50% DMF (体积分数,以下同)用于实验。

2.2 方 法

2.2.1 细胞毒性

在 96 孔细胞培养板上,将 4×10^5 /mL 的 C8166, MT-4 或 H9/HIV-1_{III_B} 的细胞悬液 100 μ L 与 100 μ L 不同稀释度浓度的光敏剂混合,每个稀释度 3 个重复孔,2 h 后,630 nm 波长激光进行照射,能量密度为 0.3 J/cm²。置 37 °C 下,用 5% CO₂ 培养箱培养 3 天,每孔吸弃 100 μ L 上清,加入 MTT 溶液(质量浓度为 4 mg/mL) 20 μ L,置 37 °C 5% CO₂ 培养箱中孵育 4 h,加入 100 μ L 10% SDS-50% DMF 溶液,保持 37 °C 过夜。BIO-TEK ELx800 ELISA 仪测定 OD 值,测定波长为 570 nm,参考波长 630 nm。计算细胞活性和 IC₅₀。细胞生存率

$$S = \frac{OD_{\text{PDT groups}}}{OD_{\text{control group}}} \times 100\%.$$

2.2.2 病毒感染性的滴定

HIV-1_{III_B} 按常规方法改良进行滴定。将 HIV-1 贮存液在 96 孔板上作 4 倍梯度稀释,10 个梯度,每梯度 6 个重复孔,每孔加入 C8166 细胞悬液 50 μ L (3×10^5 /mL),每孔终体积 200 μ L。37 °C, 5% CO₂ 培养箱中孵育。第 3 天补加新鲜 RPMI-1640 培养基 100 μ L。第 7 天在倒置显微镜下观察每孔中 HIV-1 诱导细胞病变效应(CPE),以每孔是否有合胞体的形成确定。按 Reed & Muench 方法计算 HIV-1_{III_B} 的 TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infection Dose)。

2.2.3 HIV-1_{III_B} 诱导的急性感染病毒复制的抑制

抗病毒活性实验参考郑永唐教授所创抗 HIV 活性筛药系统,进行必要的改动^[17,18]。在 96 孔细胞培养板上,对光敏剂进行 2 倍倍比稀释,每个稀释度设 3 孔,共 6 个稀释度,每孔 100 μ L。AZT 作为阳性对照药物。每孔分别滴加 8×10^5 /mL 的 MT-4 细胞悬液和 HIV-1_{III_B} 上清各 50 μ L (感染复数为 0.3)。每孔终体积为 200 μ L。分别在 2 h, 3 h, 4.5 h, 6 h 和 14 h 后,以 630 nm 波长激光进行照射,能量密度 0.3 J/cm²。同时设不照光和不光敏剂以及既不照光也不光敏剂的空白对照组。置

37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。感染后第 3 天补加 100 μL 新鲜培养基。第 5 天用噻唑蓝(MTT)比色方法用 ELx800 酶标仪测定 OD_{595/630 nm} 值。计算对 HIV-1_{III_B} 感染细胞的保护率。细胞生存率

$$S = \frac{OD_{PDT\ groups} - OD_{HIV\ infected\ control\ group}}{OD_{HIV\ uninfected\ control\ group}} \times 100\%$$

2.2.4 HIV-1_{III_B} 诱导的慢性感染病毒复制的抑制

在 96 孔细胞培养板上,将光敏剂进行倍比稀释,每个稀释度设置 3 个重复孔,每孔 100 μL, AZT 为阳性药物对照。每孔滴加 100 μL 浓度为 4×10⁵/mL HIV-1_{III_B} 慢性感染 H9 细胞(HIV-1_{III_B}/H9)。2 h 后以 630 nm 波长激光进行照射,能量密度为 0.3 J/cm²。同时设不照光和不含光敏剂以及既不照光也不含光敏剂的空白对照组。置 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 3 天。收集培养上清, Triton-X 100 灭活。采用捕捉 p24 抗原酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 PDT 对 HIV-1 复制的抑制作用。

2.2.5 细胞-细胞融合的抑制

不同浓度的光敏剂加入 HIV-1_{III_B} 慢性感染 H9 细胞中混匀,共同孵育 2 h,离心,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍,完全培养基重悬,调细胞浓度为 2×10⁵/mL,铺 96 孔板,每孔 50 μL,同时每孔加入 50 μL C8166 细胞(浓度为 6×10⁵/mL),分别于 0, 15 min, 30 min 和 60 min 时进行照光。T-20 为阳性药物对照。每组 3 个复孔,置 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中共培养 6 h,在倒置显微镜下计数合胞体的形成,计算抑制率。

2.2.6 病毒-细胞融合的抑制

不同浓度的光敏剂和 HIV-1_{III_B} 原液等体积混合,共同孵育 1 h。加入 100 倍体积的 C8166 细胞悬液中(浓度为 4×10⁵/mL)(感染复数为 0.3),4 ℃ 共同孵育 1 h,离心,PBS 洗两遍,完全培养基重悬,调细胞浓度为 2×10⁵/mL,铺 96 孔板,每孔 200 μL,分别于 0, 10 min, 20 min, 40 min 和 80 min 时进行照光。T-20

为阳性药物对照。置 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中共培养 3 天,在倒置显微镜下计数合胞体的形成,并收集培养上清, Triton-X 100 灭活。采用捕捉 p24 抗原 ELISA 方法检测 PDT 的抑制作用。

2.2.7 游离病毒的灭活

在 96 孔细胞培养板上,5 倍倍比稀释的光敏剂和 HIV-1_{III_B} 原液各 50 μL 等体积混合,共同孵育 1 h。然后以 630 nm 波长激光进行照射,能量密度 0.3~4.8 J/cm²。0.1% H₂O₂ 为阳性药物对照。将上述混合液稀释 100 倍,加入 200 μL MT-4 细胞中(浓度为 2×10⁵/mL)(感染复数为 0.3)。置 37 ℃, 5% CO₂ 培养箱中培养。感染后第 3 天补加 100 μL 新鲜培养基。第 5 天用 MTT 方法用 EL×800 酶标仪测定 OD_{595/630 nm} 值,计算对 HIV-1_{III_B} 感染细胞的保护率。

3 结 果

3.1 细胞毒性

亚甲蓝加可见光照射是目前唯一一项被认可的可用于血浆病毒灭活的光动力方法,在欧洲一些国家已被批准用于临床^[19]。但由于亚甲蓝和核酸的亲合力非常高,因此有潜在致畸性,用于活体必须谨慎。在本实验中亚甲蓝用来与新型光敏剂血卟啉单甲醚作对照。在 MB-PDT 和 HMME-PDT 对人 T 淋巴细胞系 C8166, H9/HIV-1_{III_B} 和 MT-4 的毒性试验中(图 1),前者的毒性是后者的 10 倍左右,这就充分表明了血卟啉单甲醚的毒性小的优势。由于 HMME 和 MB 溶液都有较深的颜色,虽然实验中已经做了颜色的本底对照,但是与培养基混合后,当活细胞过少导致 MTT 紫色较浅时,偶尔会出现负值。为了研究 PDT 对 HIV 复制的抑制作用,在后面的实验中选择了使宿主细胞活性在 80% 以上的剂量,即 HMME 剂量小于 10 μg/mL, MB 剂量小于 1 μg/mL。

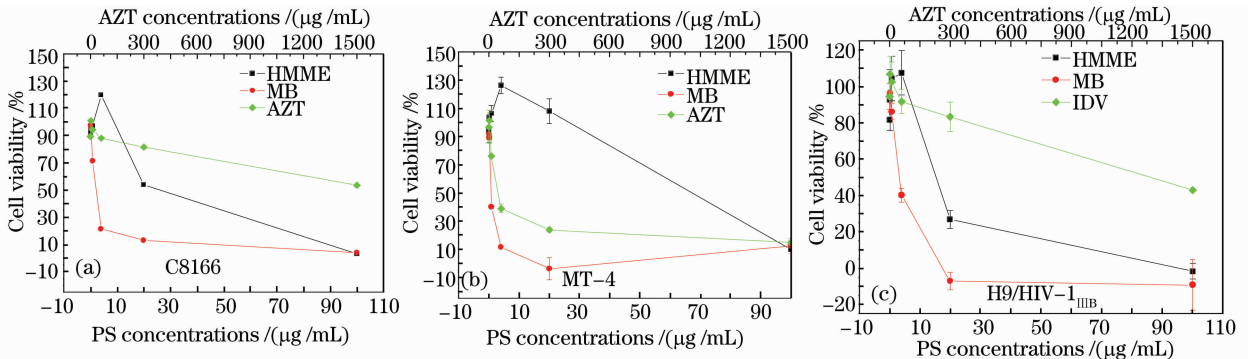


图 1 PDT 对宿主细胞的毒性

Fig. 1 Cytotoxicity of photodynamic therapy on host cells

3.2 PDT 对 HIV-1_{III_B} 急性感染的抑制作用

HIV-1_{III_B} 急性感染 MT-4 细胞后将进行粘附、侵入、逆转录、整合、复制、新病毒的组装和出芽等过程,而根据实验研究发现粘附和侵入过程大约在 2 h 内完成,因此本实验中不同时间给予光动力作用,旨在对病毒侵入后的复制过程的抑制进行研究。结果表明,HMME-PDT 和 MB-PDT 对病毒侵入宿主细胞后的复制过程都没有明显影响(如图 2),病毒感染后 3 h,4.5 h,6 h 和 14 h 时 PDT 作用对于病毒感染致 MT-4 死亡没有保护作用,都在以 0 为基线上下浮动。而病毒感染后 2 h 时 HMME-PDT 作用

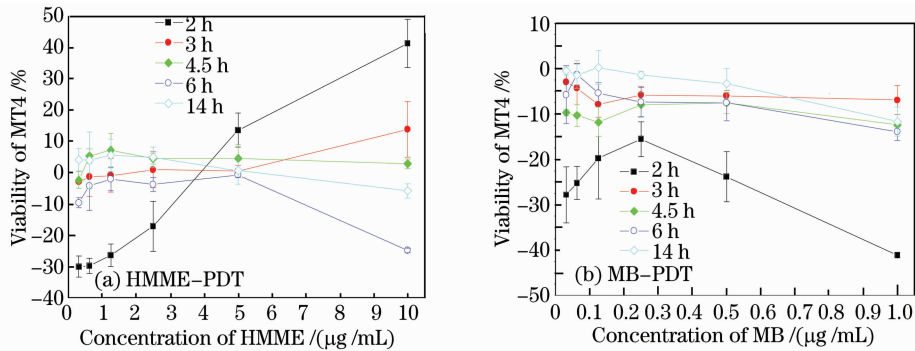


图 2 PDT 对 HIV-1_{III_B} 急性感染的抑制作用

Fig. 2 Activation of PDT to inhibit the acute infection induced by HIV-1_{III_B}

3.3 PDT 对 HIV-1_{III_B} 慢性感染的抑制作用

P24 抗原的产生可间接反映病毒感染的强弱。PDT 对 HIV-1_{III_B} 慢性感染的抑制实验的结果表明, HMME-PDT 和 MB-PDT 都不能有效抑制 H9/HIV-1_{III_B} 的 P24 抗原的产生(如图 3), 治疗指数(TI)分别是 2.65 和 1.41, 小于标准 10, 也远远小于阳性对照药物 IDV 的 220.38(如表 1 所示, 其中 EC₅₀ 为半数有效浓度, CC₅₀ 为半数致死浓度, TI 为治疗指数)。图 3 中 P24 抗原的抑制主要原因是 PDT 对 H9/HIV-1_{III_B} 的毒性作用。

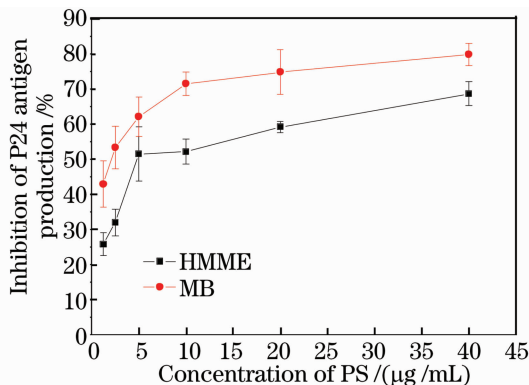


图 3 PDT 对 HIV-1_{III_B} 慢性感染的抑制作用

Fig. 3 Inhibition of chronic infection by PDT

在光敏剂小剂量时 MT-4 死亡增加, 大剂量时死亡减少。可能原因是光敏剂小剂量时 PDT 作用较小, 而弱激光生物刺激作用明显, 促进了病毒的进入, 感染 MT4 细胞比正常感染 MT4 细胞增多, 最终导致 MT4 细胞存活率减少, 由于 MT4 细胞存活率是以与正常感染 MT4 细胞的存活率比较后的差值进行计算的, 因此图 2 中这部分数值为负; 而大剂量时 PDT 作用使得病毒部分死亡, 感染 MT4 细胞比正常感染 MT4 细胞减少, 最终导致 MT4 细胞存活率增加[如图 2(a)]。

表 1 PDT 抗 HIV 慢性感染的实验数据

Table 1 Data about anti-HIV chronic infection of PDT

	HMME-PDT	MB-PDT	IDV
EC ₅₀	4.74 μg/mL	2.00 μg/mL	0.68 μmol/L
CC ₅₀	12.57 μg/mL	2.83 μg/mL	150.85 μmol/L
TI	2.65	1.41	220.38

3.4 PDT 对细胞-细胞融合的抑制作用

细胞-细胞融合是 HIV 病毒感染的一个重要途径。实验结果表明 PDT 对细胞-细胞融合有明显的抑制作用, 并对感染时间和 PDT 剂量有依赖性, 即随着感染时间的延长抑制作用减弱, 而随着 PDT 剂量的增加抑制作用增强(在细胞活性达 80% 以上的 PDT 剂量范围内); 但当 HMME 质量浓度为 2.5 μg/mL 时, 在感染的 0 和 15 min PDT 抑制效应高于质量浓度 10 μg/mL 和 5 μg/mL, 原因可能是后两者有少量细胞因 PDT 作用而死亡, 而随着时间的延长, 光敏剂在两种细胞中稀释, PDT 致细胞死亡的影响消失, 同样, MB 为质量浓度 0.5 μg/mL 时 PDT 的抑制作用高于质量浓度 1 μg/mL 的原因也类似。在细胞-细胞融合的初始阶段, HMME-PDT 和 MB-PDT 的抑制作用都达到最强, 分别为 64.68% 和 61.56%(图 4)。

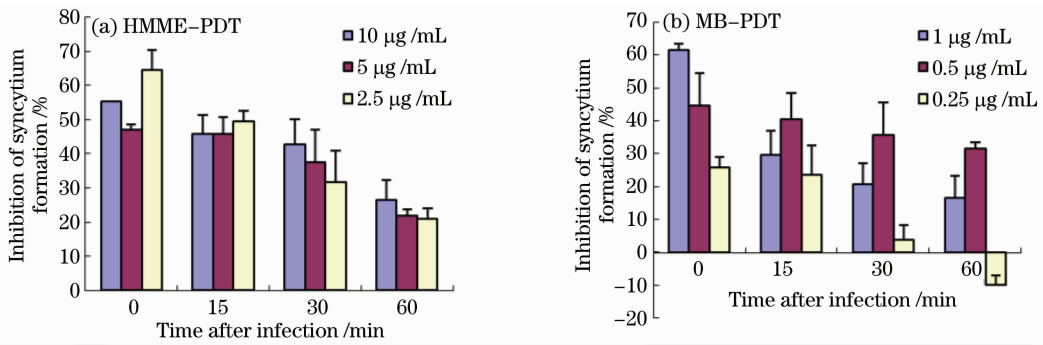


图4 PDT对细胞-细胞融合的抑制作用

Fig. 4 Activation of PDT to inhibit cell-cell fusion induced by HIV-1_{III_B}

3.5 PDT对病毒-细胞融合的抑制作用

实验结果表明 PDT 能显著抑制病毒-细胞融合,并对感染时间有依赖性,感染时间越长抑制作用越弱。但其整体抑制作用比对细胞-细胞融合的抑制作用强,在融合初始阶段 HMME-PDT 和 MB-PDT 的抑制率分别达到 85% 和 73.64% (图 5)。

3.6 PDT对游离病毒的灭活作用

PDT 可显著灭活游离 HIV-1_{III_B} 病毒,其灭活效应呈 PDT 剂量依赖性,即随着光敏剂剂量的增加和激光能量密度的增加, HIV-1_{III_B} 病毒的灭活率随之增加。当 HMME 质量浓度大于 20 µg/mL 时, PDT 的灭活效应曲线趋于平台期,且其灭活率最高

可达到 100%; MB-PDT 对游离 HIV-1_{III_B} 病毒的灭活曲线与 HMME-PDT 类似,且其达到平台期时 MB 的质量浓度在 1 µg/mL 左右 (图 6)。

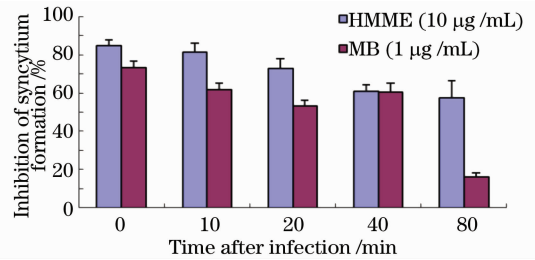
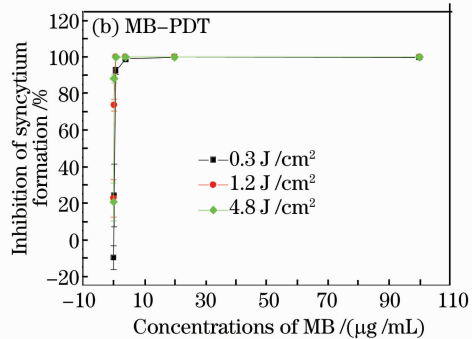
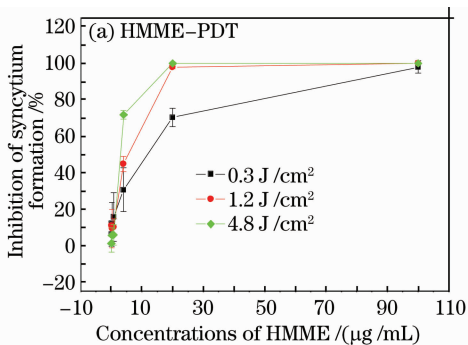


图5 PDT对病毒-细胞融合的抑制作用

Fig. 5 Activation of PDT to inhibit virus-cell fusion induced by HIV-1_{III_B}图6 PDT对游离 HIV-1_{III_B} 病毒的灭活效应Fig. 6 Inactivation on cell-free HIV-1_{III_B} by PDT

4 讨 论

人免疫缺陷病毒是艾滋病的致病病毒^[20]。虽然人们投入大量的资金和科研力量研究出了 20 多种抗艾滋药物^[21],但是由于药物不良反应和耐药病毒株的出现,探索可行的新的艾滋病治疗方法仍是一大议题。

20 世纪 90 年代,人们在研究血液制品净化中发现, PDT 可灭活 HIV 病毒。实验发现^[22]以 HIV-1 为实验病毒,通过 MB 与可见光(640 nm)单独及联合作用于含病毒的模拟全血,采用 MT4 细胞感

染法评价病毒的灭活效果。当全血中 MB 浓度分别为 5, 10, 15 µmol/L 时,以 40000 lx 强度的可见光分别照射 30, 20, 10 min, 可完全杀灭实验滴度为 10^{5.78} TCID₅₀ HIV-1 病毒。Horowitz 等^[23]用浓度 10~25 mmol/L 的酞菁化铝氯盐(AIPc),以短弧光灯为光源,在 44~176 J/cm² 的照射剂量下,持续照射 30 min,可灭活大于 10^{3.6}~10^{4.2} 的 HIV。这个现象的发现使更多目光聚焦在 PDT 和艾滋病毒的关系上。D. S. Dimitrov 等^[24]研究发现以膜探针 PKH26 标记细胞后给予光照(40 mW/cm², 2 min)可显著抑制由含 gp120-gp41 编码基因的重组病毒

诱导的细胞与细胞膜融合和病毒与细胞膜融合。C. Vever-Bizet 等^[25]则发现以红光照射二氢卟吩可显著增加磷酸二酯脱氧寡核苷酸对 gp120 抗原抗体结合的抑制作用。这些研究都提示 PDT 有可能对 HIV 的复制感染起到抑制作用。但是由于当时光敏剂的不良反应显著,更多的研究倾向于从各方面提高光敏剂的活性和安全性。血卟啉单甲醚^[26]是国产新型二代卟啉类光敏剂,是从 HPD 中提取出来的高纯度光敏剂,具有避光时间短和安全性高等优点,其单态氧产量是 HPD 的 5 倍。它目前已经处于 III 期临床试验阶段。本课题组先前的实验证明 HMME-PDT 能够抑制牛免疫缺陷病毒的复制^[27],因此本实验以血卟啉单甲醚为光敏剂,以自制半导体激光器为光源,对 HIV 复制的全过程进行 PDT 研究,对 HIV 的光灭活效应有较系统的了解。结果表明, HMME-PDT 对游离 HIV 和 HIV 诱导的细胞与细胞膜融合和病毒与细胞膜融合都有明显的抑制作用,但对于融合后的逆转录、整合和转录等复制过程则没有显著影响。这与文献报道结果相似,并且本实验比较了 HMME-PDT 和 MB-PDT 的效应,发现虽然在 HIV 的光化学抑制作用上,两者区别不大,但是后者的毒性却在前者 10 倍以上,这充分说明 HMME 作为新型光敏剂的优势。

5 结 论

全面而系统地检测了新型光敏剂 HMME 介导的 PDT 对 HIV 在宿主细胞中复制增殖的影响,结果表明, HMME-PDT 能显著抑制 HIV 诱导的膜融合过程且能灭活游离病毒。并提示 HMME-PDT 有成为艾滋病防治手段的可能。但是如何将 HMME-PDT 应用于临床治疗艾滋病,还有大量的工作要做。HIV 病毒的临床株、耐药株和变异株等对 HMME-PDT 的反应, PDT 的各种组成因素剂量的变化对效应的影响, PDT 对在体 HIV 的效果, 机体免疫系统对 PDT 的应答, 以及 PDT 在体给药系统的实施方案等都需要进行研究。总之, 本文的研究为艾滋病的防治提供了一种新的可能。

参 考 文 献

- 1 P. G. Calzavara-Pinton, M. Venturini, R. Sala. Photodynamic therapy: update 2006. part 1: Photochemistry and photobiology [J]. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2007, **21**(3): 293~302
- 2 A. Juarranz, P. Jaén, F. Sanz-Rodríguez *et al.*. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications [J]. *Clin. Transl. Oncol.*, 2008, **10**(3): 148~154
- 3 B. T. Petersen, R. Chuttani, J. Croffie *et al.*. Photodynamic therapy for gastrointestinal disease [J]. *Gastrointest Endosc.*, 2006, **63**(7): 927~932
- 4 A. Sieroń, A. Kościarz-Grzesiok, A. Kawczyk-Krupka *et al.*.

- Application of photodynamic therapy in the treatment of premalignant and malignant changes of head and neck [J]. *Wiad Lek.*, 2008, **61**(10~12): 283~287
- 5 P. Jichlinski. Photodynamic applications in superficial bladder cancer: facts and hopes [J]. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2006, **25**(1~2): 441~451
- 6 C. M. Moore, D. Pendse, M. Emberton *et al.*. Photodynamic therapy for prostate cancer a review of current status and future promise [J]. *Nat. Clin. Pract. Urol.*, 2009, **6**(1): 18~30
- 7 Zhang Hongyu, Ma Wenjiang, Zou Zhaohui *et al.*. Generation of antitumor vaccines for H22 tumor on mouse using photodynamic therapy [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(4): 631~634
- 张红雨, 马文江, 邹朝晖 等. 光动力法制备抗小鼠 H22 肝癌的肿瘤疫苗 [J]. 中国激光, 2008, **35**(4): 631~634
- 8 L. R. Braathen, R. M. Szeimies, N. Basset-Seguín *et al.*. Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. international society for photodynamic therapy in dermatology, 2005 [J]. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2007, **56**(1): 125~143
- 9 G. Buggiani, M. Troiano, R. Rossi *et al.*. Photodynamic therapy: off-label and alternative use in dermatological practice [J]. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2008, **5**(2): 134~138
- 10 J. N. Silva, P. Filipe, P. Morlière *et al.*. Photodynamic therapy: dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic [J]. *Biomed. Mater. Eng.*, 2008, **18**(4~5): 319~327
- 11 A. Derkacz. Laser therapy application in invasive cardiology. current state and future trends [J]. *Przegl. Lek.*, 2004, **61**(1): 35~38
- 12 M. Wainwright. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy [J]. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2003, **21**(6): 510~520
- 13 D. Kacerovska, K. Pizinger, M. Kumpova *et al.*. Genital warts treated by photodynamic therapy [J]. *Skinmed.*, 2007, **6**(6): 295~297
- 14 Bo Baoxue, Gao Xin, Qiao Zhongliang *et al.*. Characteristics of high power volume-Bragg-grating external cavity semiconductor lasers [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(4): 501~504
- 薄报学, 高欣, 乔忠良 等. 大功率体光栅外腔半导体激光器的输出特性 [J]. 中国激光, 2008, **35**(4): 501~504
- 15 Shi Jiawei, Liang Qingcheng, Cao Junsheng *et al.*. Junction voltage saturation and quality of high power semiconductor lasers [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, **35**(9): 1346~1349
- 石家伟, 梁庆成, 曹军胜 等. 高功率半导体激光器电压饱和特性与器件质量 [J]. 中国激光, 2008, **35**(9): 1346~1349
- 16 Xia Wei, Ma Deying, Wang Ling *et al.*. High power 650 nm red semiconductor laser with transparent window [J]. *Chinese J. Lasers*, 2007, **34**(9): 1182~1184
- 夏伟, 马德营, 王翎 等. 高透腔面大功率 650 nm 红光半导体激光器 [J]. 中国激光, 2007, **34**(9): 1182~1184
- 17 R. R. Wang, L. M. Yang, Y. H. Wang *et al.*. Sifuvirtide, a potent HIV fusion inhibitor peptide [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, **382**(3): 540~544
- 18 R. R. Wang, Q. Gu, Y. H. Wang *et al.*. Anti-HIV-1 activities of compounds isolated from the medicinal plant *Rhus chinensis* [J]. *J. Ethnopharmacol.*, 2008, **117**(2): 249~256
- 19 M. Wainwright. Methylene blue derivatives suitable photoantimicrobials for blood product disinfection [J]. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2000, **16**(4): 381~394
- 20 S. Kiertiburanakul, S. Sungkanuparph. Emerging of HIV drug resistance: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention [J]. *Curr. HIV Res.*, 2009, **7**(3): 273~278
- 21 S. K. Chiao, D. L. Romero, D. E. Johnson. Current HIV therapeutics: mechanistic and chemical determinants of toxicity [J]. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 2009, **12**(1): 53~60

- 22 B. G. Solheim, J. Seghatchian. Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma; an overview [J]. *Transfus. Apher. Sci.*, 2006, **35**(1): 83~90
- 23 B. Horowitz, S. Rywkin, H. Margolis-Nunno *et al.*. Inactivation of viruses in red cell and platelet concentrates with aluminum phthalocyanine (AIPc) sulfonates [J]. *Blood Cells.*, 1992, **18**(1): 141~149
- 24 D. S. Dimitrov, R. Blumenthal. Photoinactivation and kinetics of membrane fusion mediated by the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein [J]. *J. Virol.*, 1994, **68**(3): 1956~1961
- 25 C. Vever-Bizet, A. S. Boutorine, O. Delgado *et al.*. Targeting of HIV gp120 by oligonucleotide-photosensitizer conjugates. light-induced damages [J]. *FEBS Lett.*, 1999, **462**(3): 467~471
- 26 Yu Li, Li Xiaoyuan. Advances in the second generation of photosensitizer hematoporphyrin monomethyl ether and its clinical applications [J]. *BME & Clin. Med.*, 2005, **9**(6): 365~368
- 于 丽, 李晓原. 第二代光敏剂血卟啉单甲醚及其临床应用研究进展[J]. *生物医学工程与临床*, 2005, **9**(6): 365~368
- 27 Huijuan Yin, Yingxin Li, Zhaohui Zou *et al.*. Inactivation of bovine immunodeficiency virus by photodynamic therapy with HMME[J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2008, **6**(12): 944~946